La Pediatria - **Rivista quindicinale d'igiene e di medicina dell' infanzia**
diretta da R. JEMMA - Estratto dal vol. 32, fasc. 12, 1924

Ricerche sulle inclusioni leucocitarie nella scarlattina ed in altre malattie infettive

dei

Dottori G. CARTIA e S. RAPISARDI
Assistenti volontarii



Stab. Tip. " LA NUOVISSIMA „
Portamedina alla Pignasecca, 44.
Telefono 28-32 - Napoli - 1924.

La Pediatria - Rivista quindicinale d'igiene e di medicina dell' infanzia
diretta da R. JEMMA - Estratto dal vol. 32, fasc. 12, 1924

Ricerche sulle inclusioni leucocitarie nella scarlattina ed in altre malattie infettive

dei

Dottori G. CARTIA e S. RAPISARDI
Assistenti volontarii



Stab. Tip. " LA NUOVISSIMA „
Portamedina alla Pignasecca. 44.
Telefono 28-32 - Napoli - 1924.

Istituto di Clinica Pediatrica della R. Università di Roma
diretto dal prof. Caronia

Tra le prime affermazioni di Hallier (1869), che riscontrava nel sangue degli scarlattinosi dei cocchi cui dava il nome di " Tilletia scarlatinosa „ ed i recenti rigorosi studii di Di Cristina, Caronia e Sindoni (1921-1923), numerosi si sono susseguiti tentativi ed indagini intorno alla ricerca dell' agente etiologico della scarlattina.

Sorvolando sui particolari, ricorderemo il " bacterium punctum „ di Coze e Feltz (1872), il " monas scarlatinosa „ di Klebs, il " bacillus scarlatinae „ di Jamieson ed Edington ecc. Ma a tutte queste forme svariate di germi venne negata ogni importanza etiogenetica superandosi così questo primo periodo di confusionismo.

Segue più tardi una nuova serie di ricerche più scientifiche seguite con tecnica più rigorosa e che riguardano l' importanza etiologica attribuita allo streptococco.

Gli studi in proposito occuparono un largo stuolo di ricercatori che posero in campo diverse, varietà tra cui lo " streptococcus conglomeratus „ di Kurt, lo " streptococco scarlattinoso „ di d' Espine ecc., mentre altri furono d' avviso trattarsi dello streptococco banale. Oggi infatti non si ammette più che si possano avere differenze morfologiche tra lo streptococco dell'eresipela e gli streptococchi riscontrati nella scarlattina, opinione che s'accorda con la tendenza generale attuale che i diversi streptococchi non sono che una varietà d'una stessa specie.

Ad uno " streptococco emolitico „ più di recente autori americani hanno voluto dare importanza etiologica (Dick, Gordon,

Tunnicliff, Dochez, ecc.); adducendo tutta una serie di assai suggestive prove sperimentali.

La verità si è che lo streptococco è l' agente determinante gran parte delle complicanze; non l'agente etiologico della scarlattina, ormai del resto ben individuato dal Di Cristina e dal Caronia.

Un'altra parte di ricerche non meno importanti segna un terzo periodo nella storia degli studi etiologici della scarlattina e riguarda speciali inclusioni osservate nel protoplasma delle cellule epidermiche o degli organi ed in quello dei leucociti polinucleari.

Infatti, mentre ancora si discuteva sull'importanza etiologica dello streptococco, il Mallory (1904) riferiva di aver riscontrato nelle sezioni di cute dei cadaveri di quattro scarlattinosi, dei corpicciuoli di forma variabile che occupavano l'interno delle cellule epidermiche o gli interstizi intercellulari del derma, e che per la loro morfologia e i caratteri tintoriali classificava come forme protozoarie cui era da dar valore etiologico per la scarlattina.

Alcuni anni dopo. forme analoghe, riscontrate nelle fauci, cute, sangue, polpa splenica di 25 scarlattinosi, descriveva Gamaleia, ma che riteneva diverse dal " Ciclasterion scarlatinalis „ illustrato dal Mallory.

Successivamente nel 1911 il Bernhardt riscontrava delle nuove inclusioni che con il metodo di colorazione di Heidenheim si presentavano simili a quelle che si osservano nel tracoma.

Lo stesso anno Cantacuzène richiamava l'attenzione su un corpuscolo di forma arrotondata che nei preparati colorati col Giemsa presentava una zona periferica di color rosso vivo ed una centrale viola.

Ma è nel 1912 che Döhle segnala di aver spesso constatato nei preparati di sangue proveniente da 30 casi di scarlattina, delle inclusioni leucocitarie disposte nel protoplasma dei polinucleari in numero vario e consistenti in granuli rotondi od ovalari di grandezza varia, spesso accoppiati con le parti a contatto appiattite, forme bacillari, a pera, a grossi filamenti ondulati ecc. L'autore riteneva doversi trattare d'una spirochete, agente causale della malattia, di cui si osservavano le forme di degenerazione.

Queste nuove ricerche suscitavano l'interesse degli studiosi ed avevano conferma da parte di Kretschmer, Nicolle Williams, Franken ed altri, i quali però non emisero alcuna ipotesi sulla vera natura di queste inclusioni leucocitarie.

Lo Schwenke per primo negava ad essi ogni specificità per la scarlattina per averle riscontrate in affezioni del tutto differenti e particolarmente nella polmonite, morbillo, tifo, eresipela, difterite ecc.

Cominciava così a tramontare l'importanza etiologica ed il valore diagnostico delle inclusioni leucocitarie del Döhle, quando Amato richiamava l'attenzione su nuove inclusioni leucocitarie da lui costantemente ed esclusivamente riscontrate nel sangue degli scarlattinosi.

Sono formazioni rappresentate da corpicciuoli di forma rotondeggiante, leggermente ovalare, ellittica, allungata, sino a forme irregolarmente triangolari o quadrangolari ad angoli assai spesso arrotondati, o a forma di falce o di mezzaluna. Col metodo di colorazione usato dall'autore, Azur II-Eosina, si presentano colorate in azzurro, colorazione che assumono anche le inclusioni del Döhle, lasciando spiccare nel loro interno uno o più granuli colorati in rosso vivo o rosso violaceo, che poco o nulla differiscono dalle granulazioni dei leucociti in cui si riscontra l'inclusione.

A questi granuli a comportamento tintoriale cromatinico, non descritti dal Döhle nelle sue inclusioni, l'autore ritiene di dare la principale importanza, ammettendo l'ipotesi che si debba trattare di un'entità vivente da ascriversi tra i cosidetti virus filtrabili, probabile agente etiologico della scarlattina, mentre la zona colorabile in azzurro che li circonda non sarebbe che un prodotto di reazione cellulare forse a carattere degenerativo, determinato dal primo.

Con ricerche di controllo Veronese, Tron, Pauli hanno voluto assegnare a queste inclusioni non solo un valore specifico nei riguardi della scarlattina, nonostante Tron le abbia riscontrate in un caso di morbillo, ma anche valore patogeno, sostenendo la stessa ipotesi emessa dall'Amato e cioè che il granulo colorato in rosso rappresenti un'entità vivente, probabile agente etiologico della scarlattina.

Sul significato e sulla natura delle inclusioni in genere ben poco si sa e si vaga ancora nel campo delle pure ipotesi.

Alcuni autori hanno dato una interpretazione protozoaria, ipotesi ormai abbandonata poichè inclusioni sono state osservate e in soggetti sani e in malattie ad etiologia ben conosciuta; da altri (Chiarolanza, Pane) sono state interpretate quali granulazioni batteriche.

Bongartz, occupandosi dei corpi di Döhle, pensò potersi trattare di semplici frammenti nucleari, ma molti oppongono che i corpi inclusi si differenziano nettamente per diversità tintoriali dai nuclei, e sono spesso lontani da questi e quasi costantemente indipendenti. Secondo Lippmann sarebbero dei prodotti di distruzione cellulare inglobati dai leucociti.

La maggioranza degli autori sono d'accordo nell'ammettere che le inclusioni in genere rappresentino l'espressione di un processo patologico (produzioni determinate da tossine batteriche), negando ogni importanza etiologica.

Veronese infine ammette che molte delle presunte inclusioni non siano che ammassi di plastina, mentre sarebbero delle vere inclusioni i corpi di Döhle che rappresenterebbero una reazione cellulare ad un agente non dimostrato, probabilmente tossico, che può essere però di svariata provenienza, e che solo le inclusioni descritte da Amato sarebbero specifiche per la diagnosi di scarlattina.

Oggi però che la conoscenza etiologica della scarlattina è un fatto compiuto, viene a cadere qualsiasi discussione sull'ipotetico valore etiopatogenetico delle diverse inclusioni leucocitarie; resta piuttosto a stabilire il loro vero significato e se si può loro attribuire un carattere di specificità ai fini diagnostici.

In tal senso abbiamo creduto interessante intraprendere delle opportune ricerche, non tralasciando di prendere in esame, oltre ai corpuscoli di Döhle e di Amato, le altre inclusioni leucocitarie descritte precedentemente.

Con tali ricerche, che abbiamo eseguite nel sangue degli scarlattinosi ricoverati nel reparto isolamento della R. Clinica Pediatrica di Roma, e che abbiamo estese alle affezioni più svariate ed ai soggetti sani, ci siamo proposti di stabilire:

1°) Quali punti di contatto ed analogie si possono riscontrare tra i corpi di Döhle, di Amato e le altre inclusioni leucocitarie descritte.

2°) Se i corpi Döhle e quelli di Amato sono un reperto costante e di facile riscontro tale da poter essere utilizzata la loro ricerca per la diagnosi di scarlattina.

3°) Se essi sono specifici per l'infezione scarlattinosa.

Il sangue veniva prelevato dal polpastrello del dito, eseguendo gli strisci su vetrini nuovi previamente sgrassati.

Per la fissazione abbiamo in genere preferito l'alcol metilico purissimo.

Per la colorazione ci siamo serviti del Giemsa e del metodo con azur II-eosina, seguendo accuratamente la tecnica dettata da Amato e che qui riportiamo: soluzione di eosina A. G. 1/20000, soluzione di azur II 0.8 °/₀₀: al momento dell'uso si mescolano 2 ccm. di questa con 25 ccm. della soluzione di eosina. I preparati vengono immersi capovolti nella soluzione colorante per la durala di alcune ore, da 3 a 3 $^1/_2$-4, avendo cura di cambiare di ora in ora il liquido colorante specie se si son formati precipitati. Si pratica quindi un prolungato lavaggio con acqua distillata: in caso di colorazione intensa si può immergere per qualche minuto il preparato in alcool assoluto.

Sorvoliamo qui su tutti quei minuti particolari di tecnica, che si acquistano con una larga esperienza, necessari per ottenere una colorazione perfetta.

Abbiamo seguito inoltre i metodi indicati dal Döhle per la colorazione delle sue inclusioni. Dopo aver fissato lo striscio in alcool, colorazione con una miscela di reagente di Hoppe-Seylers per lo zucchero (acido ortonitro-fenil-propiolico in soluzione alcalina) 2 parti su 100 di acqua distillata e 6 parti di bleu-azzurro di Michaelis. Durata della colorazione da 6 a 24 ore.

Meno comodo ma migliore perchè i nuclei si colorano in bleu scuro e le inclusioni in bleu più chiaro, è questo secondo metodo: dopo aver fissato, colorare con una miscela di Orseille in soluzione acida ed ematossilina acida secondo Ehrlich in parti uguali. Lasciare più ore i preparati immersi, differenziare in soluzione alcoolica di acido cloridrico.

Per l'osservazione ci siamo serviti dell'obbiettivo 2 mm. immers. omog. ap. numer. 1,40 e degli oculari 4-6-8 comp.

Le nostre ricerche riguardano complessivamente 107 casi, di cui 35 di scarlattina e gli altri di malattie varie e di soggetti sani.

In un' unica tabella riassumiamo i casi presi in esame distinti secondo la forma morbosa, indicandone il numero complessivo per ogni singola malattia ed il numero dei reperti positivi o negativi nei riguardi delle inclusioni leucocitarie di Döhle e di Amato:

Affezioni morbose prese in esame	Numero dei casi	Corpusc. di Amato		Corpi di Döhle	
		Positivi	Negativi	Positivi	Negativi
Scarlattina	35	18	17	24	11
Polmonite	11	5	6	4	7
Tifo	7	3	4	4	3
Difterite	14	6	8	9	5
Varicella	10	1	9	3	7
Broncopolmonite	4	—	4	—	—
Influenza	3	—	9	—	3
Reumatismo articolare ac.	1	—	1	—	1
Meningite epidemica	2	—	2	2	—
Morbillo	2	—	2	—	2
Eruzione da siero	1	—	1	—	1
Carbonchio	1	—	1	—	1
Flemmone	1	—	1	—	1
Eresipela	3	—	3	2	1
Pertosse	1	—	1	—	1
Morbo di Pick	1	—	1	—	1
Atrofia	1	—	1	—	1
Peritonite tubercolare	1	—	1	—	1
Bronchite fetida	1	—	1	—	1
Morbo di Barlow	1	—	1	—	1
Idrofobia	1	—	1	1	1
Soggetti sani	5	—	5	—	5
	107				

Dei 35 casi di scarlattina presi in esame come risulta dalla precedente tabella, solo 18 hanno dato reperto positivo nei riguardi dei corpi di Amato (51,4 °/₀) e cioè poco più della metà; pressochè alla stessa percentuale perviene Pauli nel suo lavoro, in quanto chè su 107 casi di scarlattina ne ha avuti positivi 62 (57 °/₀).

In tutti i casi il sangue è stato prelevato sempre durante il periodo esantematico ed a vari intervalli nello stesso caso. Il metodo di colorazione che ci ha dato risultati migliori è stato quello stesso proposto da Amato e che è servito anche bene per il riscontro dei corpi di Döhle.

L'osservazione è stata quasi sempre laboriosa e paziente; spesso, anche nei casi positivi, è stato necessario non solo scorrere attentamente tutto un preparato prima di trovare un corpo incluso, ma di ricorrere all'osservazione di più preparati.

Più abbondanti ed in un numero di casi di gran lunga superiore abbiamo riscontrato i corpi descritti dal Döhle.

I casi negativi li abbiamo considerati tali dopo un lungo e ripetuto esame di vari strisci di sangue.

Non possiamo conseguentemente convenire con Tron che cioè la ricerca dei corpi di Amato nella scarlattina sia " un reperto di facile dimostrazione e positivo anche nelle forme leggerissime ed atipiche della malattia ".

In alcuni casi abbiamo riscontrato delle forme che per la loro morfologia e per la colorazione assunta si possono attribuire alle inclusioni descritte dal Gamaleia, mentre in due casi di strisci colorati col Giemsa si son trovate le forme tipiche per la loro colorazione del Cantacuzène.

Per quanto riguarda le ricerche sul sangue di varie affezioni non scarlattinose, l'esame paziente ed accurato ci ha fatto pervenire a risultati che molto si discostano da quelli ottenuti dagli autori precedenti.

Infatti abbiamo rinvenuti i caratteristici corpi di Amato in 5 casi di polmonite su 11 presi in esame; nel tifo in 3 casi su 7; nella difterite in 6 su 14; e nella varicella in 1 su 10. Nel rimanente delle malattie prese in esame e nei soggetti sani la ricerca è stata sempre negativa, ma ciò non ci autorizza ad escludere l'eventuale presenza d'inclusioni, data la scarsità dei casi esaminati.

In tutte le malattie ove sono state riscontrate le inclusioni leucocitarie di Amato, più due casi di eresipela ed un caso di meningite epidemica, si son trovati i corpi di Döhle, e sempre con maggior frequenza ed in una percentuale di casi superiore.

*
* *

Non c' intratterremo a descrivere minutamente la morfologia delle inclusioni leucocitarie da noi rinvenute sia nella scarlattina che nelle altre affezioni in quanto che corrisponde esattamente alla descrizione fattane dai diversi autori.

Diremo solo che, nei riguardi dei corpi di Amato, nessuna differenza abbiamo potuto notare tra le inclusioni rinvenute nella scarlattina e quelle rinvenute nelle altre malattie, e che la forma che più comunemente è capitata alla nostra osservazione è costituita da un corpuscolo azzurrognolo a forma ovalare contenente uno, e più raramente due o più granuli, di colorito rosso-scarlatto, disposti al centro o verso la periferia; meno comune sono le forme rotonde, a falce, a mezzaluna o irregolarmente triangolari.

Nella tavola annessa sono riprodotte alcune di queste forme rinvenute nella scarlattina, nel tifo, nella polmonite, nella difterite.

Diremo infine che i corpi di Döhle da noi osservati presentano anch' essi una morfologia assai svariata quanto quella dei corpi di Amato e sia gli uni che gli altri assumono una colorazione azzurrognola più o meno intensa: unico segno differenziale è la presenza dei granuli rossi, che contraddistingue i corpi di Amato.

Viene così a mancare la specificilà dei corpi di Amato, per la scarlattina, come è mancata per i corpi di Döhle, se sostanziale differenza vogliamo ammettere, ed in base al reperto positivo in malattie ad etiologia perfettamente nota (tifo, difterite, polmonite) cade l'ipotesi, sorpassata del resto dalla scoperta già avvenuta dell'etiologia della scarlattina, che il granulo rosso rappresenti un' entità vivente, probabile agente etiologico della scarlattina, e l'alone azzurro un prodotto di reazione cellulare determinata dal primo.

Ci sorprende il fatto che nessuno degli sperimentatori che ci hanno preceduti, eccetto Tron che li ha riscontrati in un caso

di morbillo, abbia trovato i corpi di Amato in altre malattie: ciò molto probabilmente è da addebitarsi a scarsezza di osservazioni nelle affezioni non scarlattinose.

Non intendiamo porre ipotesi sulla natura e il significato dei corpuscoli endoleucocitari di Amato, riteniamo però che anche questi si debbono far rientrare tra le varie inclusioni leucocitarie descritte finora ed il cui vero significato, malgrado le ipotesi avanzate dai diversi autori, è tuttora sconosciuto.

Il fatto però di averli riscontrati anche in una affezione prevalentemente a tipo tossiemico qual' è la difterite, c'induce a ritenere più vicina al vero l'ipotesi che si debba trattare di degenerazione cellulare.

Intanto in forza dei risultati ottenuti dalle ricerche finora compiute ci sentiamo autorizzati a dedurre le seguenti

Conclusioni

1°) Tra tutte le inclusioni leucocitarie quelle che si riscontrano con più frequenza e che hanno caratteri ben definiti sono i corpi di Döhle e quelli di Amato. Essi, mentre diversificano da tutti gli altri (Gamaleja, Bernhardt, Cantacuzène), presentano tra loro grande analogia: sono difatti simiglianti per forma e per colorazione e si differenziano solo per la presenza di piccole granulazioni rosse che contraddistinguono i corpi di Amato;

2°) Nè i corpi di Döhle, nè quelli di Amato sono un reperto costante e sicuro nella scarlattina, riscontrandosi i primi in circa il 70 % dei casi e i secondi in poco più del 50 %, e la loro ricerca è lunga e laboriosa;

3°) Sia i corpi di Döhle, che quelli di Amato non rappresentano un reperto parassitario e non hanno alcun carattere di specificità per la scarlattina, potendosi riscontrare in altre malattie, quali il morbillo, il tifo, la polmonite, la difterite, la varicella.

BIBLIOGRAFIA

Amato. Lo Sperimentale, 1913. — Amato. Lo Sperimentale, 1921. — Amato. Comunicazione all'Accad. Med. Fis. Fiorentina, 1922. — Amato. Centr. f. Bakt., 1923. — Amato. Riv. di Clin. Pediatrica, 1923. — Amato. Lo Sperimentale, 1923. — Cantacuzène. C. R. Soc. de Biol., 1911 — Caronia. e Sindoni. La Pediatria, 1923. — Chiarolanza. Atti della R. Acc. Med. Chirurgica di Napoli, 1907. — Di Cristina. La Pediataia, 1921. — Di Cristina. La Pediatria, 1923. — Döhle. Centralbl. f. Bakt., Orig., 1912. — Gamaleia. Berlin. Klin. Woch., 1908. — Hoeppli. Centr. f. Bakt. Orig., 1921. — Kretschmer. Berlin. Klin. Woch., 1912. — Kretschmer. Deut. Med. Woch., 1912. — Pane. Atti della R. Acc Med. Chir. di Napoli, 1907. — Pauli. Lo Sperimentale, 1924. — Salimbeni. C. R. Acc. des Sciences. 1914. — Tron. Lo Sperimentale, 1922. — Veronese. Tip. E. Pizzati e L, Scudier. Padova, 1922.

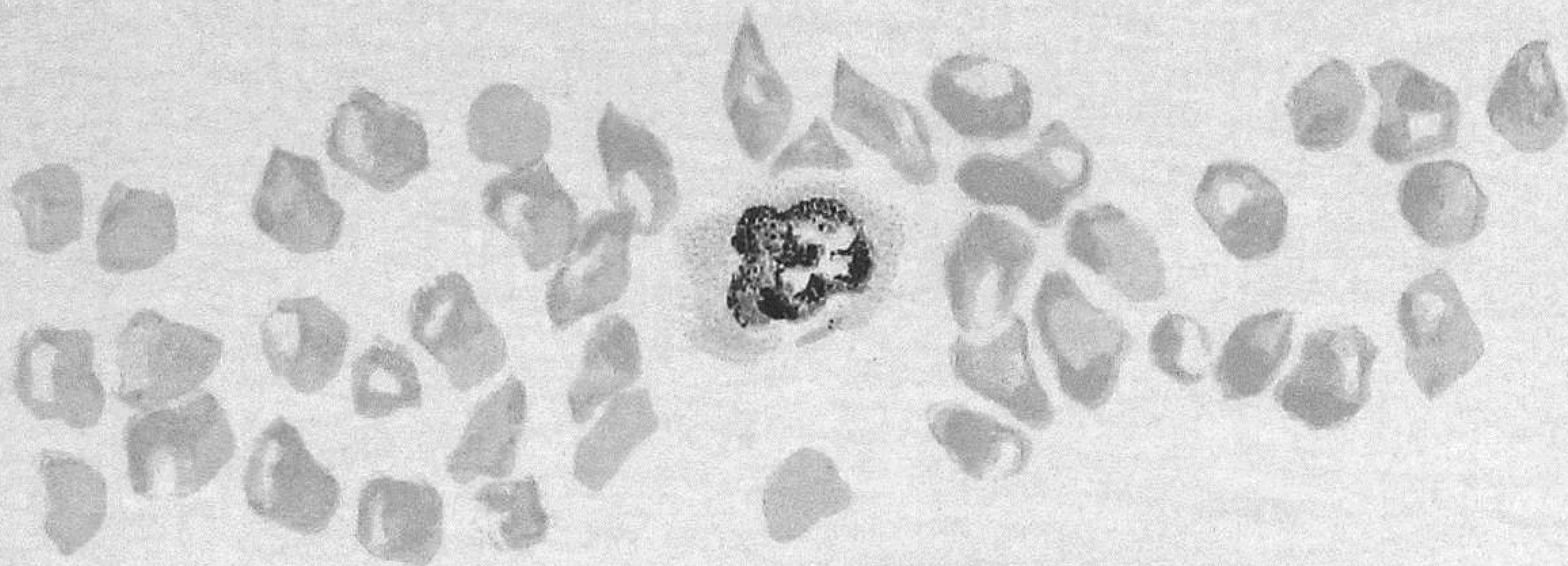


Fig.1 Inclusioni leucocitarie nella scarlattina (Corpusc. di Amato)



Fig.2 Inclusioni leucocitarie nella difterite (Corpusc. di Amato)

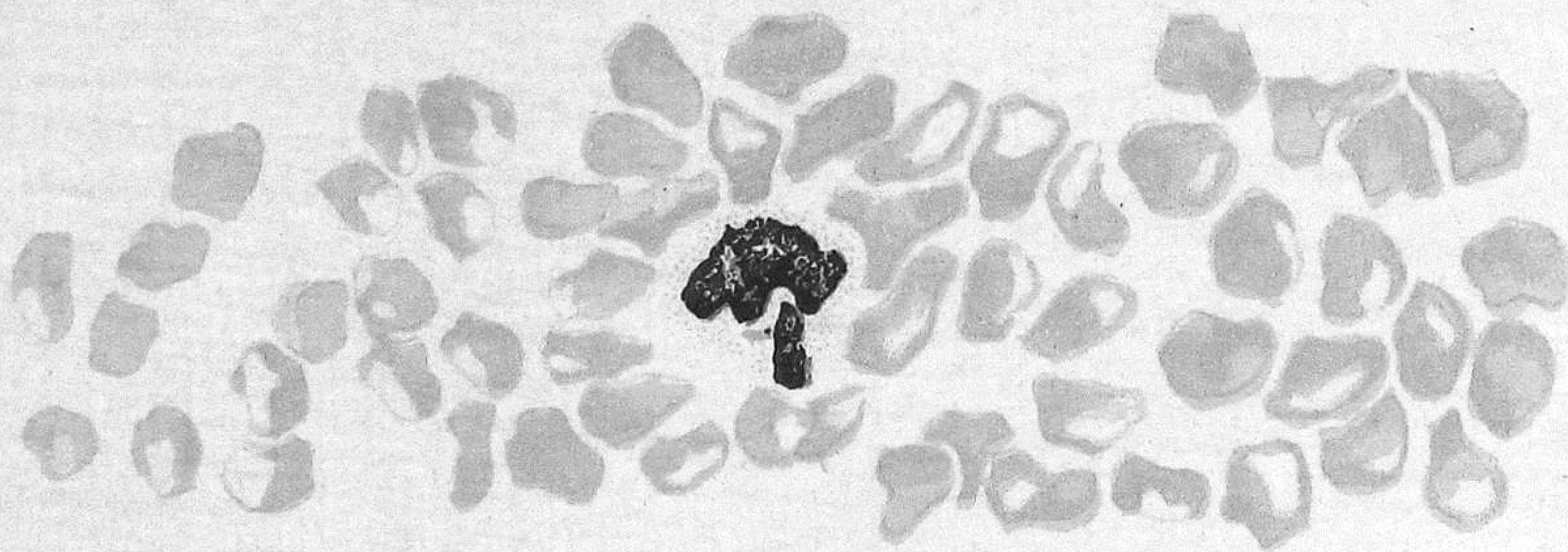


Fig.3 Inclusioni leucocitarie nella polmonite (Corpusc. di Amato)



Fig.4 Inclusioni leucocitarie nel tifo (Corpusc. di Amato)